

angiogenesis of ECs. These findings provide a new alternative approach for cell therapy of cardiovascular pathologies associated with impaired angiogenesis that might include injection of EPCs treated with PPARalpha MPs.

Supported by Fondation de France.

D014

LES CELLULES MONONUCLÉÉES "LINEAGE NEGATIVE" ISSUES DE LA MOELLE OSSEUSE SONT UNE SOURCE IMPORTANTE DE CELLULES PROGÉNITRICES ENDOTHÉLIALES

V. BARBAY¹, V. RICHARD², J.-Y. BORG¹, O. BOYER¹, C. THUILLIEZ², E. BRAKENHIELM²

¹ CHU de Rouen, Rouen, France

² Inserm U644, Rouen, France

Objectif — La thérapie cellulaire basée sur l'utilisation de cellules progénitrices endothéliales (CPE) issues de la moelle osseuse ou du sang périphérique permet d'améliorer la neovascularisation après un infarctus du myocarde. Cependant, les cellules utilisées lors de telles thérapies sont souvent hétérogènes, et leur mécanisme d'action mal connu : réelle incorporation dans la paroi vasculaire ou effet paracrine promouvant l'angiogenèse? Ainsi, nous avons voulu identifier quelle sous-population de cellules mononucléées issues de la moelle osseuse de souris contenait le plus de CPE ayant la capacité de générer des cellules endothéliales matures en culture.

Méthodes — Nous avons évalué différentes techniques de sélection : la séparation par gradient de densité qui permet d'obtenir des cellules mononucléées, les sélections magnétiques «Lineage negative» (Lin-), Sca-1+, et c-kit+ ainsi que la sélection c-kit+/VEGFR-2+. L'expression des marqueurs endothéliaux matures a été étudiée par immunocytochimie, cytométrie en flux, et RT-PCR sur les colonies obtenues.

Résultats — Les colonies apparaissaient au 8^e jour de culture. Le tri Lin- permettait d'obtenir le plus grand nombre de colonies par rapport aux autres tris. Les analyses immunocytochimiques et cytométriques montraient qu'à l'intérieur des colonies Lin-, c-kit+ et de celles dérivant des cellules mononucléées, une majorité de cellules était LDL+, Lectine+, VEGFR-2+, CD31+ et CD144+, c'est-à-dire à caractère endothélial mature. Cependant, les colonies dérivées des cellules mononucléées semblaient également contenir des cellules fibroblastiques comme le montrait une expression plus importante du gène FSP-1. Par ailleurs, la cytométrie en flux a montré que les colonies Sca-1+ n'avaient majoritairement pas un phénotype endothélial (1 à 2% de cellules VEGFR-2+ et CD31+), et que 35% des cellules exprimaient le CD11b, correspondant à un phénotype monocytaire.

Conclusion — La population cellulaire Lin- issue de la moelle osseuse de souris est une source importante de CPE. En effet, la culture de cellules Lin- paraît être la plus adaptée pour générer des cellules endothéliales matures, si on la compare à la culture de cellules Sca-1+, c-kit+ ou de cellules mononucléées. La population Lin- constituerait donc une cible de choix pour la thérapie cellulaire destinée à stimuler la vasculogénèse.

D015

ALDOSTERONE PLAYS A PRO-ANGIOGENIC ROLE BY ENHANCING VEGF-A PRODUCTION IN IMMUNE CELLS

C. WALCZAK¹, F. GAIGNIER¹, G. BELLO¹, A. GILET¹, S. THORNTON¹, P. LACOLLEY¹, A. ROPARS¹

¹ U961 Inserm, Vandœuvre-lès-Nancy, France

Background and aim — VEGF-A has been described to be an important pro-angiogenic factor. Immune cells are intimately involved in tissue repair and neovascularisation notably by their capacity to secrete VEGF-A. Moreover, these cells possess mineralocorticoid receptors. The present study was designed to investigate whether aldosterone (Aldo) was able to regulate VEGF-A production of immune cells.

Methods — HL-60 (progranulocytic) and THP-1 (promonocytic) cell lines and human blood neutrophils and monocytes were incubated for different times with Aldo (10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹M). Total cellular RNA extraction, submitted to reverse transcription and real time quantitative PCR was used to study VEGF-A mRNA expression. Cell supernatants were collected and ELISA tests were performed to analyse VEGF-A protein excretion.

Results — All four cell types increased their VEGF-A mRNA and protein production. VEGF-A mRNA expression increased from 30 mn and time for maximal expression depended on cell type: 30 mn for HL-60 and THP-1 cells, and for blood neutrophils 3 hours after Aldo addition. ELISA tests showed increased excretion of VEGF-A proteins after 24 hours of Aldo contact for all four cell types. Western-blotting performed with HL-60 and THP-1 cells showed that ERK1/2 and p38 pathways are stimulated by Aldo. ERK1/2, p38 and PI3kinase transduction signal inhibitors decreased this immune cell activation orchestrated by Aldo.

Conclusion — We have demonstrated that Aldo is able to increase VEGF-A production of phagocytic cells such as neutrophils and monocytes. This phenomenon is PI3K, ERK1/2 and p38 dependent. These cells play an important role in tissue healing notably by their capacity to degrade dead cells and to secrete pro-angiogenic factors such as VEGF-A in situ. It appears that Aldo could play an important role in this neovascularisation process by favouring cell proliferation and tissue building.

D016

ANGPTL4 MODULATES IN VIVO DEVELOPMENTAL AND PATHOLOGICAL ANGIOGENESIS

E. GOMEZ¹, M. DURAND¹, A. GALAUP¹, S. GERMAIN¹

¹ Inserm U833 — Collège de France, Paris, France

Hypoxia is a potent inducer of angiogenesis during which endothelial cells (ECs) undergo modulations of cell-cell and cell-matrix interactions. ANGPTL4 expression is induced by hypoxia in ECs (1,2) and interacts with the extracellular matrix (3) modulating ECs adhesion, migration and sprouting through cytoskeleton reorganisation (4).

Objective — Analyse whether in vivo ANGPTL4 plays a role in modulating hypoxia-driven angiogenesis in the retina, both in development and in vascular retinal pathologies.

Materials — C57/Bl6 angptl4KO mice and WT littermates were used. An hyperoxia chamber was used to establish the oxygen-induced retinopathy (OIR). Mice were exposed to 75% oxygen from P7 to P12 leading to retinal vessel loss. After returning to room air, hypoxia induces neovascularisation, evaluated at P17 when greatest.

Results — Developmental angiogenesis of the retina in P5-P7 pups was analysed. Angptl4 is expressed by ECs and angptl4 $-/-$ retinas show a decreased number of branchpoints ($p < 0,005$) as well as an increased vascular density ($p < 0,001$). Angptl4 $-/-$ veins were dilated compared to angptl4 $+/+$ ($p < 0,001$). Altogether, loss of angptl4 expression in the developing retina lead to an immature vascular plexus. Moreover, angptl4 $-/-$ retinas showed an increased basal vascular leakage ($p < 0,05$). Confocal analysis also showed that pericyte coverage might be involved.

We also show that ANGPTL4 is expressed during OIR by ECs. Retinal wholemount preparations stained with isolectin B4 were performed. At P12, the retinal vaso-obiterated area was not affected in angptl4 $-/-$ mice, suggesting that ANGPTL4 has no effect in the hyperoxia-induced vaso-obiteration. In contrast, the neovascular angiogenic response was significantly altered in angptl4 $-/-$ mice at P17 ($p < 0,001$). Thus, ANGPTL4 is essential for regulating the growth of new retinal vessels in an ischemic environment.

Conclusions — Altogether, this data demonstrate that ANGPTL4 plays a critical role in hypoxia-induced angiogenesis, both in developmental and pathological conditions, by affecting 1) vascular density, 2) basal vascular permeability, and 3) pericyte coverage.

(1) Le Jan S, *Am J Path.* 2003

(2) Galaup A, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006

(3) Cazes A, *Circ Res.* 2006

(4) Chomel C, *FASEB J.* 2008

D017

SONIC HEDGEHOG-MEDIATED ANGIOGENESIS IN THE MOUSE ISCHEMIC LIMB REQUIRES OSTEOPONTIN

F. ROBBESYN¹, M.-A. RENAULT¹, D. DARET¹, I. BELLOC¹, C. ALLIERES¹, R. BEN NAYA¹, C. DESGRANGES¹, A.-P. GADEAU¹

¹ Inserm U828, Pessac, France

Purpose — Sonic Hedgehog (Shh), a morphogen involved in embryonic development, stimulates repair of ischemic myocardium and skeletal muscle (Pola et al 2003 and Kusano et al 2005). Shh was shown to induce both the formation of new vessels and their muscularization. However the mechanisms involved in these processes are still poorly understood. We investigated the hypothesis that the angiogenic and chemotactic protein osteopontin (OPN) was involved in the angiogenic effect of Shh.

Methods and Results — We used a plasmid transfection strategy to increase Shh expression in the ischemic region of the limb and we compared the effect of Shh overexpression in wild type (OPN $+/+$) and OPN deficient (OPN $-/-$) 12-weeks-old mice transfected either with Shh plasmid (pShh) or control plasmid (β -gal). Shh overexpression induced a significant increase in the number of new vessels ($+ 22\% \pm 4.2$) in OPN $+/+$ mice in comparaison with β -gal transfected wild type mice, moreover the Shh effect was lost in OPN $-/-$ mice. Analysis of vessel muscularization showed that Shh mainly increased the number of small non-muscularized vessels. In parallel, we observed an increased number of OPN expressing cells in the ischemic lesion mainly localized close to or inside debasing/regenerating muscle fibres. These cells expressed Mac3 and F4/80 markers suggesting a macrophage phenotype. We suggested that shh could increase the migration of macrophages in an OPN-dependent manner in order to accelerate the repair of the ischemic tissue. The

experiments related to the function of OPN in ischemic limb stimulated or not by Shh is currently under investigation.

Conclusion — Our results demonstrated that OPN is required for the Shh angiogenic effect in the ischemic tissue and suggest that osteopontin expression may be associated with a better migration of macrophages in the ischemic lesion under Shh stimulation.

Kusano KF et al. *Nat Med.* 2005; 11:1197-1204.

Pola R et al. *Circulation.* 2003; 108:479-485.

D018

ETUDE DE L'INTERACTION ENTRE LE PEDF ET LE RÉCEPTEUR DE LA LAMININE 37LRP/67LR

A. BERNARD JAOU¹, Z. LI¹

¹ UR4 Physiologie, Physiopathologie et Vieillesse, Paris, France

Pigment Epithelium derived factor (PEDF) est une protéine multifonctionnelle qui possède des propriétés neurotrophiques, neuroprotectrices, anti-oxydantes et anti-inflammatoires. Le PEDF est aussi l'un des plus puissants inhibiteurs de l'angiogénèse, jouant un rôle important dans l'inhibition de la croissance et l'invasion tumorale, ainsi que dans la dispersion des métastases. Des données expérimentales indiquent que deux peptides du PEDF, 34-mer et 44-mer, sont capables de se fixer à deux récepteurs distincts de 60 kDa et 80 kDa à la surface des cellules endothéliales et nerveuses respectivement. Le PEDF est capable d'interagir, par des interactions de type ionique, avec le collagène de type I, l'héparine et les glycosaminoglycans présents dans la matrice extracellulaire. Son activité peut en outre être modulée par phosphorylation par des exokinases présentes dans la circulation sanguine.

Afin d'identifier des partenaires potentiels du PEDF, nous avons utilisé la technique de double hybride en criblant une banque d'ADNc musculaire avec comme appât le PEDF et découvert que le récepteur de la laminine 67LR était un récepteur du PEDF. Des expériences de co-immunoprécipitation, de co-purification et de résonance plasmonique de surface ont permis de vérifier cette interaction in vitro. La méthode de double hybride nous a permis d'identifier deux domaines distincts du PEDF et deux domaines 67LR, proches du site de fixation de la laminine, capables d'interagir. Deux peptides P46 et P326 (25-mer et 28-mer respectivement), issus des domaines du PEDF, interagissent avec le domaine extracellulaire de 67LR dans des expériences de résonance plasmonique de surface, induisent l'apoptose, inhibent la migration, la croissance et la formation de réseau de cellules endothéliales en culture. La fixation spécifique du peptide P46 couplé à la fluorescéine à la surface des cellules endothéliales en culture a été observée et est inhibée par la fixation préalable d'un anticorps anti-67LR. L'inhibition par le PEDF, P46 et P326, de la néovascularisation de la cornée induite par FGF2 a en outre été montrée in vivo chez la souris. L'ensemble de nos résultats indique que 67LR est un récepteur fonctionnel du PEDF, impliqué dans l'activité anti-angiogénique du PEDF.